

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21057

研究課題名(和文) Photobiomodulation活性型歯根膜由来幹細胞による再生療法の新展開

研究課題名(英文) Development of periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells activated by photobiomodulation

研究代表者

新見 ひろみ (Niimi, Hiromi)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・医員

研究者番号：60907971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：レーザー照射されたPDL-MSCは、6 J/cm²、8 J/cm²での照射によって、細胞が傷害されずに増殖活性が有意に促進された。6 J/cm²での照射3日後に、ALP活性は非照射群と比べて有意に上昇していた。骨芽細胞分化誘導培地にて培養したPDL-MSCに対し、週に1度6 J/cm²、8 J/cm²で照射すると、3週間後の石灰化面積が有意に増加していた。また、レーザー照射によりPDL-MSCの骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現が上昇しており、照射6時間後のRNA-seqによる網羅解析で、3J/cm²で45個、6 J/cm²で111個、8 J/cm²で155個の発現変動遺伝子が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在一般的に臨床応用されている、サイトカインや成長因子などを応用した歯周組織再生療法は、再生の範囲に限界がある。歯周組織再生療法の鍵として注目されるヒト由来歯根膜組織由来間葉系幹細胞(PDL-MSC)は、ヒト他家移植による安全性と有効性も確認され、既に他家移植のための細胞バンクも樹立されているが、細胞の状態により再生に差異があり、より再生に適したPDL-MSCの作出が求められている。本研究によって、レーザーの光エネルギーによるphotobiomodulation効果がPDL-MSCの再生能へ与える影響の一端が明らかになり、光エネルギーを応用した新たな歯周組織再生療法開発の糸口とできる。

研究成果の概要(英文)：Laser irradiation of PDL-MSCs at 6 J/cm² and 8 J/cm² significantly promoted proliferative activity without cell injury, and ALP activity was significantly increased 3 days after irradiation at 6 J/cm² compared with the non-irradiated group. The calcified area of PDL-MSCs cultured in osteoblast differentiation induction medium was significantly increased after 3 weeks of weekly irradiation at 6 J/cm² and 8 J/cm², respectively. In addition, laser irradiation increased the expression of osteoblast differentiation marker genes in PDL-MSCs. Comprehensive analysis by RNA-seq 6 hours after irradiation revealed 45 differential expression genes (DEGs) at 3 J/cm², 111 DEGs at 6 J/cm², and 155 DEGs at 8 J/cm².

研究分野：Photobiomodulation

キーワード：PDLMSC Er:YAG Laser Photobiomodulation

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在一般的に臨床応用されている、細胞をリソースとしないサイトカインや成長因子などを応用した歯周組織再生療法は、再生の範囲に限界がある。再生の適応範囲を広げるため、ヒト由来の歯根膜組織由来間葉系幹細胞(**PDL-MSC**)をシート状に加工してヒトへの移植を実施し、安全性と有効性が報告されている(①)。免疫拒絶のない **PDL-MSC** は他家移植も可能で、既に他家移植のための細胞バンクも樹立されている(②)。しかしながら、**PDL-MSC** の状態により再生に差異があることも明らかになっており、より再生に適した **PDL-MSC** の作出が求められている。

(2) 間葉系幹細胞 (**MSC**) に光エネルギーを応用することによって、適応条件によって細胞増殖が促進すること、未分化マーカーである **OCT4**、間葉系幹細胞マーカーである **CD90** の発現が上昇すること、骨分化に有利となる **Runx2**、**Osterix** の発現上昇および石灰化が促進することが文献により明らかになっており(③)、光エネルギーによって **MSC** の分化制御を行える可能性が考えられる。しかしながら **PDL-MSC** に対する光エネルギーの応用に関する報告はなく、その効果やメカニズムは不明であった。

<引用文献>

Iwata T, Yamato M, Washio K, Yoshida T, Tsumanuma Y, Yamada A, Onizuka S, Izumi Y, Ando T, Okano T, Ishikawa, I. Periodontal regeneration with autologous periodontal ligament-derived cell sheets—a safety and efficacy study in ten patients. *Regenerative therapy*, 9, 38-44, 2018.

Onizuka S, Iwata T. Application of Periodontal Ligament-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets for Periodontal Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(11), 2796, 2019.

Ohsugi Y, Niimi H, Shimohira T, Hatasa M, Katagiri S, Aoki A, Iwata T. In vitro cytological responses against laser photobiomodulation for periodontal regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(23), 9002, 2020.

2. 研究の目的

(1) 本研究では、世界で初めての **PDL-MSC** への光エネルギーの応用実験を行い、レーザーの光エネルギーによる **photobiomodulation** 効果が **PDL-MSC** の再生能へ与える影響を網羅的に解析する。

(2) **PDL-MSC** に光エネルギーによる **photobiomodulation** 効果を付加し、より歯周組織の再生に適した **photomodulation** 活性型 **PDL-MSC** を得ることで、**PDL-MSC** を用いた歯周組織再生療法の治療成果を更に上げることができ、従来では抜歯もやむを得ない歯の保存が可能になると考えられる。さらに、**scRNA-seq** を行うことによって、歯髄や頭蓋骨など歯周組織以外の再生療法に活用できる **photobiomodulation** 活性型 **PDL-MSC** の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) **PDL-MSC** へのレーザー照射条件の検討

PDL-MSC へ **Er:YAG** レーザーを照射し、照射 1 日後と 3 日後に、細胞の増殖活性を **Cell Counting Kit-8** とフローサイトメトリーで、細胞傷害性の評価を **Lactate Dehydrogenase Assay** にて行う。細胞傷害を起こさずに増殖活性を促進させる照射条件を検討する。また、**PDL-MSC** を骨芽細胞分化誘導培地にて培養を行い、各条件のレーザーを照射、その後経時的にアルカリフォスファターゼ活性を評価し、骨芽細胞分化マーカーと、歯根膜細胞分化マーカーの発現を **q-PCR** にて確認する。また、レーザー照射した **PDL-MSC** を骨芽細胞分化誘導培地にて 3 週間培養後、石灰化面積の評価を **Alizarin Red S** 染色にて表面積の評価と定量評価を行う。骨芽細胞や歯根膜細胞に一番強く分化した照射条件で **RNA-seq** による網羅的遺伝子発現解析を行う。

(2) **Photobiomodulation** 効果を与えた **PDL-MSC** の網羅解析

Er:YAG レーザーを照射された **PDL-MSC** の、照射 6 時間後の遺伝子発現を **RNA-seq** にて網羅的に解析を行なう。**Gene set enrichment** 解析、**GO** 解析、**KEGG pathway** 解析を行い、レーザーを照射していない **PDL-MSC** との比較検討を行うことで、レーザー照射による **PDL-MSC** への **photobiomodulation** 効果を究明する。

4. 研究成果

(1) レーザー照射による PDL-MSC 細胞増殖活性と細胞傷害性への影響

Er:YAG レーザーを照射された PDL-MSC は、 6 J/cm^2 、 8 J/cm^2 での照射によって、照射 1 日後と 3 日後の細胞増殖活性が非照射群に比べて有意に促進された。いずれの照射によっても細胞傷害性は有意に上昇していなかった。この照射条件を採用し、非照射群、 3 J/cm^2 照射群、 6 J/cm^2 照射群、 8 J/cm^2 照射群のレーザー照射 6 時間後の遺伝子発現を、RNA-seq にて網羅的に解析を行なった。

(2) レーザー照射された PDL-MSC の骨芽細胞分化誘導培養への効果

照射 3 日後に、 6 J/cm^2 でレーザー照射された PDL-MSC のアルカリフォスファターゼ活性が非照射群と比べて有意に上昇していた。

骨芽細胞分化誘導培地にて培養した PDL-MSC に対し、週に 1 度 6 J/cm^2 、 8 J/cm^2 で照射すると、非照射群や 3 J/cm^2 照射群と比較して、3 週間後の石灰化面積が有意に増加していた。

レーザー照射された PDL-MSC は、照射 6 時間後には骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現が有意に上昇しており、この時点での遺伝子発現変動の網羅的解析を行なった。

(3) Photobiomodulation 効果を与えた PDL-MSC の網羅解析

照射 6 時間後において RNA-seq 解析を行い、 $\text{FDR} < 0.1$ 、 $|\text{Fold Change}| > 1.5$ を発現変動遺伝子 (DEGs) とした。 3 J/cm^2 照射群では、DEGs が 45 個のうち Down-regulate された遺伝子が 18 個、Up-regulate された遺伝子が 27 個であった。 6 J/cm^2 照射群では、DEGs が 111 個のうち Down-regulate された遺伝子が 44 個、Up-regulate された遺伝子が 67 個であった。 8 J/cm^2 照射群では、DEGs が 155 個のうち Down-regulate された遺伝子が 63 個、Up-regulate された遺伝子が 92 個であった。

レーザー照射した 3 群に共通な DEGs もあり、今後、Er:YAG レーザーによる PDL-MSC への Photobiomodulation 効果のさらなるメカニズム解明に迫っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimohira T, Niimi H, Ohsugi Y, Tsuchiya Y, Morita K, Yoshida S, Hatasa M, Shiba T, Kadokura H, Yokose S, Katagiri S, Iwata T, Aoki A	4. 巻 39
2. 論文標題 Low-Level Erbium-Doped Yttrium Aluminum Garnet Laser Irradiation Induced Alteration of Gene Expression in Osteogenic Cells from Rat Calvariae.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photobiomodulation, photomedicine, and laser surgery	6. 最初と最後の頁 566-577
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/photob.2020.4958	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohsugi Y, Hatasa M, Katagiri S, Hirota T, Shimohira T, Shiba T, Komatsu K, Tsuchiya Y, Fukuba S, Lin P, Toyoshima K, Maekawa S, Niimi H, Iwata T, Aoki A	4. 巻 49
2. 論文標題 High-frequency pulsed diode laser irradiation inhibits bone resorption in mice with ligature-induced periodontitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of clinical periodontology	6. 最初と最後の頁 1275-1288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcpe.13695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Wang Jiacheng, Morita Kazuki, Hatasa Masahiro, Niimi Hiromi, Iwata Takanori
2. 発表標題 The establishment of matrix-assisted differentiation into neural crest cells from human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大杉 勇人, 新見 ひろみ, 下平 剛, 片桐 さやか, 岩田 隆紀, 青木 章	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本歯科評論	5. 総ページ数 270
3. 書名 【レーザー再起動!-レーザーだからこそできる治療とそのエビデンス】Er:YAGレーザーの骨組織への効果のエビデンス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------